

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-505872

(43) 公表日 平成8年(1996)6月25日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 31/70	ADY	9454-4C	
48/00		8314-4C	
C 1 2 N 15/09		9281-4B	
		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願平6-517029	(71) 出願人	ユニバーシティ・リサーチ・コーポレイション
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)12月28日		アメリカ合衆国80302コロラド州、ボールダー、ユニバーシティ・アベニュー1305番
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)7月19日	(72) 発明者	サレンガー, ブルース・アラン
(86) 国際出願番号	PCT/US93/12657		アメリカ合衆国80234コロラド州、ウエストミンスター、ディケーター・ストリート11061番、アパートメント202
(87) 国際公開番号	WO94/16736	(72) 発明者	チェチ, トマス・ロバート
(87) 国際公開日	平成6年(1994)8月4日		アメリカ合衆国80303コロラド州、ボールダー、ロックマウント・サークル1545番
(31) 優先権主張番号	08/007, 745	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(32) 優先日	1993年1月22日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP		

(54) 【発明の名称】 治療剤の局所化

(57) 【要約】

ウイルス治療剤を該治療剤のウイルス標的と共にin vivoにて局所化することによる該標的に対する該ウイルス治療剤の効果をin vivoにて促進する方法。

**【特許請求の範囲】**

1. ウイルス治療剤を該治療剤のウイルス標的と共にin vivoで局所化する工程よりなることを特徴とする該標的に対する該ウイルス治療剤の効率をin vivoにて促進する方法。
2. 該治療剤がアンチセンスオリゴヌクレオチド、デコイオリゴヌクレオチド、およびリボザイムよりなる群から選択される請求の範囲第1項記載の方法。
3. 該治療剤が、該治療剤をウイルス局所化シグナルに付着させることによって局所化される請求の範囲第1項記載の方法。
4. 該ウイルス局所化シグナルがパッキングシグナルよりなる群から選択される請求の範囲第3項記載の方法。
5. 当該治療剤のウイルス標的と共にするin vivo局所化に適したウイルス治療剤。
6. 該治療剤がアンチセンスオリゴヌクレオチド、デコイオリゴヌクレオチド、およびリボザイムよりなる群から選択される請求の範囲第5項記載の方法。
7. 該治療剤が当該治療剤をウイルス局所化シグナルに付着させることによって局所化される請求の範囲第5項記載の方法。
8. 該ウイルス局所化シグナルがパッキングシグナルよりなる群から選択される請求の範囲第5項記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 治療剤の局所化

#### 発明の背景

本発明は、ウイルス疾患および他の疾患の治療に有用な方法および薬剤に関する。

ウイルス感染もしくはウイルス疾患を治療するための治療剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、デコイ (decoy) 核酸、およびリボザイムを包含する。他の薬剤は、(HIVウイルスでの感染によって引き起こされる) AIDSの治療用のAZTのごとき薬剤を包含する。一般に、これらの治療剤は患者の感染部位に投与されるか、あるいは患者の血管系を通じて循環するようにされる。

サレンガー (Sullenger) ら [63セル (Cell) 601, 1990および10モレキュラー・アンド・セル・バイオロジー (Mol. Cell Biol.) 6512, 1990] は、アンチセンスおよび／またはデコイ鋳型をコードするキメラ tRNAを使用することによってM<sub>o</sub>MLVまたはHIVの複製を阻害することを記載している。「tRNA-TAR融合転写体の細胞内局所化は測定されていない：しかしながら、プロセッシングを受けていないtRNA転写体は一般に細胞質に輸送されず、核に止まっていることが従前に示されている。t a t-TAR相互作用は核で起こり、これはtRNA-TAR転写体を発現する細胞において観察されたHIV複製の阻害に帰すことができた」 [引用省略]

イザント (Izant) ら [1アンチセンス・リサーチ・アンド・ディベロップメント (Antisense Research and Development) 371, 1991] は、アンチセンスCAT遺伝子に融合したキメラs nRNP遺伝子を記載している。転写体は卵母細胞に注射した場合に細胞質および核に見い出された。著者は、アンチセンスs nRNPは第一義的には核で機能すると信じている。

ギルボア (Gilboa) およびサレンガー (Sullenger) のWO90/13641およびギルボア (Gilboa) のWO89/11539は、前記に関連する系を記載している。これらのすべての文献をここに引用して本明細書の一部とみなす。

#### 発明の概要

その場所に止まっているか、あるいは核に輸送される阻害性RNAの従前の局所化は、直径が約 $10\mu$ の大きなオルガネラ（アルバーツ（Alberts）ら、モレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・セル（Molecular Biology of the Cell）16-17、ガーランド（Garland）出版社、ニューヨーク、ニューヨーク州1983）をアンチセンスまたはアコイRNA阻害剤で満たそうと試みた。これらの戦略は、約 $15^\circ$ — $10^\circ$ の異なる標的が核内部に存在するにも拘わらず、かかる阻害剤をいずれかの特異的mRNAおよびプレー-mRNA標的と共に特異的に局所化するものではない〔アルバーツ（Alberts）ら、モレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・セル（Molecular Biology of the Cell）409、ガーランド（Garland）出版社、ニューヨーク、ニューヨーク州1983〕。

しかしながら、本発明は、阻害性RNAを、かなり小さな区画、例えば、直径が $50\text{nm}$ で核の容量が $10^{-6}$ ないし $10^{-7}$ のレトロウイルス粒子のコアに局所化するが、そこは、単一の大きなRNAまたはDNA種、すなわちウイルスのゲノムRNAまたはDNAが存在するところである〔テルチ（Telch）、RNA腫瘍ウイルス（RNATumor Viruses）（ワイス（Weiss）ら編）25-208、コールド・スプリング・ハーバー出版社、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1984〕。局所化特異性におけるこの100万倍の差異は、ウイルスのゲノムRNAおよびDNAを細胞中のRNAおよびDNAの残りから区別するソーティング経路に治療剤を標的化することによって達成される。

対照的に、従前の局所化戦術は、多数の異なるRNA間を区別しない一般的な細胞選別経路へとRNA治療剤を標的化していた（そこでは、標的化RNAは、しばしば、標的化経路を下流に流れるRNAの全プールのパーセント程の画分よりなるにすぎなかった）。従って、本発明は、その標的につき特異的である経路へと治療剤を標的化する点で独特であり；ここに、従前の局所化戦略は一般的経路に満たそうとするものであり、そこでは、数百万の正しくない標的が正しい標的に沿って存在し、かくして、正しい標的を細胞中の多数の正しくない標的から区別する局所化シグナルを使用していない。

出願人は、標的成分、例えばRNAが局在化される特異的な細胞もしくはウイ

ルスの区画に、その病気を治療するのに有用な治療剤を局在化されるのが、ウイルス病のような病気の治療で有利なことを発見した。治療剤のかかる局所化がなければ、ほとんどまたは全く効果的な治療を観察することができない。一般に、出願人は、適当な局所化シグナルを治療剤に繋いで、それを正確に細胞内または生物（例えば、ウイルスの）局所に位置させなければならないと判断した。かかる局所化シグナルは標的をユニークに同定するか、あるいは細胞内の正しくない標的の多数から当該標的を区別する。

例えば、RNAをベースとしたウイルス複製の阻害剤は、標的RNAと同一の局所に阻害性RNAを位置させるために、ウイルスパッキングシグナル、または他の同等エレメントを用いることによって局所化できる。加えて、蛋白質をベースとした抗ウイルス剤は、蛋白質局所化シグナルキメラの抗ウイルス部分を適当な区画に局所化する該蛋白質局所化シグナルのエレメントを形成する標準的な手法を用いることによって、該キメラとして産生することができる。

かくして、第1の態様において、本発明は、ウイルス治療剤が、該治療剤のウイルス標的に与えるin vivo効果を促進する方法をその要旨とする。該方法は、該薬剤をその標的と共にin vivo局所化する工程を包含する。関連する態様において、本発明は、当該ウイルス治療剤のウイルス標的と共にin vivo局所化するのに適したウイルス治療剤をその要旨とする。

当業者ならば、現存の治療剤がウイルス標的と共に適当な区画に局所化されるように該治療剤を修飾するために多くの方法を用いることができるのを認識するであろう。これらの方法の例を以下に掲げるが、本発明はそれらに限定されるものではない。かくして、例えば、デコイRNA、リボザイム、およびRNAもしくはDNA分子のごとき（すべて当該分野でよく知られた）RNA分子は、DNA分子からin vivoで合成できるか（またはin vitroで形成でき）、それらはウイルス標的化剤と共有結合され、その例を以下に掲げる。これらの薬剤は、「局所化シグナル」と呼ばれる。別法として、蛋白質性もしくはポリペプチドの薬剤を細胞内でRNAもしくはDNAからキメラポリペプチドもしくは蛋白質の形態で生

産でき、ここに、当該ポリペプチドの1の部分は抗ウイルス効果を有し、他の部分は適当な細胞もしくはウイルス区画へと当該ポリペプチドを局所化させる。加えて、種々の治療剤がin vitroにて合成でき、多くの標準的な方法のうちの1つによって投与されて、患者内の適当な細胞区画へと投与された治療剤を標的化する。

治療剤の効果をin vivoで「促進する」とは、局所化シグナルがその薬剤を細胞内の特異的部位へと標的化し、それにより、その薬剤がより効果的に作用するようにすることを意味する。かくして、in vivoで細胞に投与されたより低濃度の薬剤は、より高濃度の局所化されていない薬剤と同等の効果を有する。標的化されたもしくは局所化された薬剤の効果のかかる増大は、当業者によく知られた標準的な手法によって測定できる。一般に、薬剤の効果は、当該薬剤がその標的に対してその所望の効果を有し得るように、当該薬剤を当該標的に近接して位置させることによって促進される。これは、当該薬剤を標的を持つ小さいはっきりとした区画（例えば、ウイルス粒子内）に位置させるか、あるいは区画内の同一の空間（例えば、標的の合成の個所における核）に位置させることによって達成できる。

局所化シグナルは、所望の区画に自然に局所化するようになるいずれの蛋白質もしくは核酸の成分も、例えば、ウイルスパッキングシグナルもしくはその同等物も包含する。局所化シグナルは、それが結合すべき分子をある区画に局所化させるシグナルは標準的な方法を用いて容易に見つけることができるので、当業者は同定できる。これらの局所化シグナルは、いずれかの所望の手法によって、例えば、局所化シグナルおよび治療剤RNAを共に同一のRNA分子の一部として生産するDNA鋳型を構築することによって、あるいは2つの部位間における共有もしくはイオン結合の形成によって、当該治療剤に繋げることができる。本発明で本質的なことのすべては、阻害性薬剤が標的部位に局所化した場合にその阻害性効果を有することができること、および局所化シグナルがその治療剤をその標的部位へと局所化できることである。有用な局所化シグナルおよび細胞区画の例は、例えば、レトロウイルス（HIV、HTLV I & II、他のヒト・レ

トロウイルス、ALV、RSV、トリ・肉腫ウイルスおよび他のニワトリ・レトロウイルス、MoMLVおよび他のマウス・レトロウイルス、FeLVおよび他のネコ・レトロウイルス、ならびにすべての他のレトロウイルスゲノムRNAパッキングシグナル)を含めた、RNAウイルスゲノム用のウイルスゲノムパッキングシグナルを包含する。また、すべての他のRNAウイルスパッキングシグナル:例えば、B型肝炎ウイルス、ならびにすべてのDNAウイルスゲノムパッキングシグナル、例えば、HSV I、ならびにアデノウイルスも含まれる。他のウイルス核酸選別シグナルは、HIVのRev応答エレメント、およびウイルスRNAもしくはDNAを何らかのユニークな方法、例えば、翻訳の間におけるレトロウイルスフレームシフティングで選別するすべての他の核酸配列を包含する。なおさらなる例は、該シグナルを含有するRNAを、正しくない多数の標的を含有しない経路に選別するすべての細胞RNA局所化シグナル;ウイルス蛋白質局所化/集合シグナル:例えば、Revもしくはgag蛋白質、またはウイルス蛋白質を何らかのユニークな方法で選別するすべての他の蛋白質をベースとするシグナル;標的・特異的細胞蛋白質ベース局所化シグナル:例えば、細胞内の正しい標的と共に特異的に局所化されるであろう蛋白質、例えば、標的化遺伝子の発現の部位にRNAseを特異的に局所化するであろうキメラ翻訳因子-RNAse蛋白質に治療剤を繋ぐことによって形成される(例えば、HIV遺伝子発現を阻害するためのNF $\kappa$ B-RNAseキメラ蛋白質);細胞内もしくは体内の標的・特異的部位へのその局所化につき選択されたすべてのRNA、DNA、または蛋白質、例えば、翻訳因子NF $\kappa$ Bに結合し、かつHIV遺伝子発現の部位へと局所化されるであろうRNA;および特異的・標的化シグナルを模擬する小さな有機分子、例えば、HIVパッキングシグナルを模擬し、かつHIVパッキング部位へ有機阻害剤を送達するのに用いることができる小さな有機分子の作成を包含する。

ウイルスの複製もしくは組立てに重要な細胞内部位におけるウイルス阻害剤濃度を増大させるのは、抗ウイルス剤の有効性を増大させるための一般的方法である。前記した共局所化戦略は、ウイルス複製の原因となる標的と共にRNAまた



は蛋白質を共標的化するためのウイルスパッキングシグナルを使用することができる。このようにして、ウイルス複製を減少または妨げることができる。この方法は、抗ウイルス剤をウイルス複製機構が活性な治療的に重要な細胞内およびウイルスの個所に選別するために該抗ウイルス剤を適当な局所化シグナルに繋ぐことによって、アンチセンスRNAおよびデコイRNAを含めた多くのかかる抗ウイルス剤の効果を増強するために使用することができる。

例えば、HIV複製の、リボザイムおよび他のRNAをベースとした阻害を改良するために、HIVパッキングシグナルおよび／またはrev応答エレメント(RRE) (カレン (Cullen) ら、58セル (Cell) 423、1989) を阻害性RNAに隣接して位置させて、破壊すべきHIV RNAと共にそれを共局所化することができる (リー (Lee) ら、4 ニュー・バイオル (New Biol.) 66、1992)。

蛋白質ベースの抗ウイルス剤の効率は、かかるウイルスマクロ分子選別経路を開発することによって改良することができる。例えば、HIVのRRE配列へのrevの局所化に必須の蛋白質エレメントを含有するキメラrev-RNAse蛋白質を作成することができる。これは、また、該キメラのRNAseを必要なHIV転写体へと局所化する。

かかる共局所化戦略は、天然の局所化シグナルの使用に限定されない。人工的に生起させたRNAおよび／または蛋白質デコイを使用することによって、抗ウイルス剤をウイルスに重要な細胞内個所へと標的化することができる (スゾスタック (Szostak)、17 TIBS 89、1992)。これらの生起した分子を選択してウイルス蛋白質に結合させ、選択した阻害剤をかかるデコイに繋げることによって、該阻害剤をウイルス標的と共に共局所化することができる。

小さな抗ウイルス分子の適当な細胞内部位への局所化は、その有用性を増大させる。例えば、AZTを、HIVがそのゲノムを逆転写する細胞内区画のみへと標的化すれば、その効率は大いに増大され、かつその副作用は減少もしくは除去される。他の非ウイルス薬物の効率は、それらを適当な細胞内区画、細胞型、またはそれらがその特別の機能を最良に発揮する器官へと標的化する系を作成する

ことによって、増強することができる。

他の態様において、本発明は、適当な局所化シグナルを用いることによって、核酸ベースの治療剤をその標的と共に共局所化することによる、該治療剤の効率をin vivoで増強する方法をその要旨とする。

本発明の他の特徴および利点は、以下のその好ましい具体例の記載および請求の範囲より明らかとなるであろう。

#### 好ましい具体例の記載

まず、図面を簡単に説明する。

#### 図面

図1 AはレトロウイルスベクターB 2 Aを表す模式図であり；図1 BはレトロウイルスベクターN 2 A : H a m  $\beta$ を表す模式図であり；図1 Cはレトロウイルスパッキング細胞における転写されたB 2 A RNAの運命を表す模式図であり；図1 Dは本発明の共局所化／阻害戦略を表す模式図である。

図2は、本発明で用いる種々のハンマーヘッド (hammerhead) ・リボザイムモチーフを表す模式図である。

図3および4は、本発明の方法によるウイルス標的化のためのモデルとしての、選択されたin vivoリボザイムによる（ウイルス力価の減少によって示した）標的ウイルスゲノムRNAの阻害を表すヒストグラムである。

#### 治療剤の標的化

ウイルス複製の阻害剤としてRNAを使用するいくつかの抗ウイルス戦略が提案されている。それらは、阻害剤としてアンチセンスRNA、デコイRNA、およびリボザイムの使用を含む（サレンジャー (Sullenger) ら、10 モレキュラー・アンド・セリュラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) 6 5 1 2、1990；サレンジャー (Sullenger) ら、63セル (Cell) 6 0 1、1990；サーベル (Sarver) ら、247サイエンス (Science) 1 2 2 2、1990）。in vitroでウイルスRNAを特異的に切断する標的リボザイムの能力は、in vivoにおける抗ウイルス剤としてのそれらの可能な治療剤効果について多くの推測を導いた（セヒ (Cech)、260、JAMA 3 0 3 0、1988；およびロッシ (Rossi)、

3カル・オピン・バイオテク (Curr. Opin. Biotech.) 3、1992)。リボザイムのもしくは他の阻害剤の抗ウイルス剤としての能力を試験管から細胞および生物に首尾よく移行させるために、これらの環境を区別する特徴が考慮されなければならない。in vitroにおけるリボザイム媒介trans-切断反応の速度は、RNAデュプレックスが溶液中で形成される速度にほとんど到達することができる。何故ならば、該RNA分子は試験管中にて溶液中を自由に拡散するからである。細胞中では、対照的に、RNAは自由に拡散しないようである。むしろ、それらは高度に区画化され、特異的細胞位置に活性的に選別されているようである (ローレンス (Lawrence) ら、87プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) 5420、1990)。in vivoにおけるウイルスRNAのかかる区画化はリボザイムに対するその利用性を減少させ得る。

出願人は、生物分子を秩序立てて区画化し、かつ事実、2種の核酸分子を非常に近接させて位置させる細胞の性質を利用する戦略を提供する。その標的と同一の細胞内の位置に阻害剤を選別することによって、その必要な作用部位における阻害剤の濃度を上昇させることができる。これは、阻害剤の効果を増大させ、投与すべき阻害剤の低用量を可能とすることによってその副作用を低下させる。

同様に、他のタイプのウイルス標的の阻害剤の効果を増大させることができる。別法として、他のタイプの薬剤も適当に標的化できる。例えば、有利な効果を提供する細胞成分の活性を増大させる薬剤である。かくして、いずれのウイルス治療剤も適当な区画内に局所化されるかまたは濃縮され、それによりその効率が増強される。同様に、他のタイプの治療剤も改良することができる。

当業者ならば、以下の実施例は本発明の非限定的な実施例であり、本発明の一般的適用を例示するのにすぎないことを認識するであろう。該実施例は、ウイルスのパッキングシグナルを用いてリボザイムを標的ウイルスRNAへと局所化できることを示す。この実施例で観察された特別の結果は、本発明の使用が薬物療法に対して有する顕著な効果を例示する。前記したごとく、本発明の適用はいずれかの特別のタイプのRNA、蛋白質、または他のタイプの治療剤に限定されず、

また、ウイルス局所化シグナルの使用に限定されず、むしろ、細胞内のいずれも  
の所望の区画へのいずれの所望の治療剤の局所化にも広く適用できる。唯一の限  
定は、治療剤がその最大効果を有する区画の決定にあるであろう。本発明では、  
局所化は、個体の治療に必要な薬剤の濃度ができる限り低くできるように、でき  
るだけ特異的であるのが望ましい。

### 実施例

特許請求された発明を説明するために、実験系を開発して、*in vivo*における  
ウイルスRNAのリボザイム媒介trans-切断が、細胞内のその標的RNAに関  
するリボザイムの共局所化によって効率的になることを示す。この実験系は、レ  
トロウイルス複製のいくつかの特性ならびにレトロウイルスベクター媒介遺伝子  
移行に関連するいくつかの技術開発を利用する。2つのタイプのレトロウイルス  
ベクター（図1Aおよび1B）を本実験で用いた。レトロウイルスベクターB2  
Aは、lacZ遺伝子を含有する（マルコビッツ（Markowitz）ら、62ジャー  
ナル・オブ・バイロロジー（J. Virol.）1120、1988）。

2種のハンマーヘッド・リボザイム（ウーレンベック（Uhlenbeck）328ネ  
イチャー（Nature）596、1987）によって、該lacZをコードする転写  
体を切断のために標的化し、かくして、リボザイム媒介阻害をレポートするため  
に使用した。レトロウイルスベクターN2A:Hamβ1Gは選択マーカーneo<sup>r</sup>およびハンマーヘッド・リボザイムをコードする。ベクターN2A:Ham  
β2Gは、lacZ暗号配列の異なる領域にそれを標的化するハンマーヘッドの  
フランキングアームの配列における改変を除いて同一である（図2）。

これらのベクターは、B2Aレトロウイルスベクター（E86/B2A）を含  
有するエコトロピックパッキング細胞系においてリボザイム含有RNAを移行お  
よび発現させるために用いた（マルコビッツ（Markowitz）ら、62、ジャーナ  
ル・オブ・バイロロジー（J. Virol.）1120、1988）。E86/B2A  
細胞において、同一のlacZをコードする転写体は2つの区別される運命を有  
する（図1C）。転写体のいくつかはmRNAとして働き、翻訳のために細胞質  
に輸送される。これらのmRNAの豊富度は、細胞内のβ-ガラクトシダーゼ酵  
素活

性のレベルを測定することによって評価できる。他の転写体はレトロウイルスベクターの複製のためのゲノムRNAとして働き、パッキング細胞の表面から出芽するウイルス粒子にパッキングされる(図2B)。これらのゲノムRNAの豊富度は、パッキング細胞から出現する1 a c Zをコードするウイルスの力価を測定することによって評価できる。

B 2 A由来転写体は出芽ウイルス粒子にカプセル化される。何故ならば、それらは、Moloneyマウス白血病ウイルス(MoMLV)パッキングシグナル $\phi$ を包含するからである。このパッキング過程は、パッキング細胞によって供給される、 $\phi$ 含有転写体を認識し、それらをウイルス出芽の部位に輸送するMoMLVキャプシド化機構の能力によって媒介される(マン(Mann)、33セル(Cell)153、1983、ゴフ(Goff)、レトロウイルスおよび病気(Retroviruses and Disease)(ハナフサ・エイチ(Hanafusa, H.)、ピンター・エイ(Pinter, A.)およびプルマン・エム・イー(Pullman M. E.)編)1-19(アカデミック・プレス・インコーポレイテッド(Academic Press, Inc.)1989)。

このMoMLVキャプシド化機構を利用して、抗-1 a c Zハンマーヘッド・リボザイムを含有する転写体を、1 a c Z標的をコードする転写体と共に共局所化した。B 2 AおよびN 2 A : H a m  $\beta$ を共に含有するパッキング細胞において、B 2 AおよびN 2 A : H a m  $\beta$ に由来するRNAは、共に、翻訳およびパッキング双方につき標的化される(図1D)。かかる細胞において、B 2 AおよびN 2 A : H a m  $\beta$ ゲノムRNA転写体は、MoMLVキャプシド化機構によって、パッキング細胞の表面のウイルス出芽部位に共局所化される。各レトロウイルス粒子は2つのゲノムRNAを含有するので、基質-およびリボザイム-含有ゲノムは共パッケージングされる(図1D)(バルマス(Varmus)ら、RNA腫瘍ウイルス(RNA Tumor Viruses)(ワイス・アール(Wiess, R.)、テイチ・エヌ(Teich, N.)、バルマス・エイチ(Varmus, H.)およびコフィン・J(Coffin, J.)編)369-512(コールド・スプリング・ハーバー出版社、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1984およびパンガニバン(Panganiban)241サイエンス(Science)1064-1069(1988))。従って、もしハンマーヘッ

ド・リボザイムが活性であって、標的配列がこれらのゲノムRNAに接近可能であれば、共局所化は切断の効率を上昇させ、これらの細胞から出現するlacZコード化ウイルスの力価は減少されるであろう。

加えて、mRNAとして働くlacZおよびHamβ転写体は共局所化されないようである。何故ならば、2つの転写体は、細胞染色体上の距離ある部位に一体化されたプロウイルスから生起するからである（ローレンス（Lawrence）ら、87 Proceedings of National Academy of Sciences (Proc. Natl. Acad. Sci.) 5420、1990、バルマス（Varmus）ら、RNA腫瘍ウイルス（RNA tumor Viruses）（ワイス・アール（Wiess, R.）、テイチ・エヌ（Teich, N.）、バルマス・エイチ（Varmus, H.）およびコフィン・J（Coffin, J.）編）369-512（コールド・スプリング・ハーバー出版社、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1984）。mRNAは、それが転写される核の場所によって決定される転写体についての異なる象限を介して翻訳される（ラープ（Raap）ら、1977 Exp. Cell Res. 319、1991）。従って、もしリボザイムおよび基質RNAの共局所化が細胞内の基質RNAのtrans-切断を増強するならば、β-ガラクトシダーゼ蛋白質生産は、これらの細胞におけるlacZウイルス力価よりも少量だけ減少されるはずである。

この現象を説明するために、N2A:Hamβ1GおよびN2A:Hamβ2Gレトロウイルスベクターを、2つの異なるハンマーヘッド・リボザイムに対応するオリゴヌクレオチドをベクターN2Aのポリクロニング部位に結ぶことによってクローン化した（図2）（ハンツォポウロス（Hantzopoulos）ら、86 Proceedings of National Academy of Sciences (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 3519、1989）。不活化ハンマーヘッド配列、Hamβ1D（図2）をN2Aに挿入して、これらの実験におけるリボザイム活性の重要性についての対照として供した。Hamβ1Dは、ハンマーヘッド・リボザイムの触媒コアにおいて単一のヌクレオチド欠失を含有する（図2）。かかる突然変異はin vitroでハンマーヘッド・リボザイムの触媒活性をほとんど除去

することが示されている（ルフナー（Ruffner）ら、29バイオケミストリー（Biochem.）10695、1990）。

N2A:Hamβ1G、N2A:Hamβ2G、N2A:Hamβ1D、および親N2Aレトロウイルスベクターを両性パッキング細胞系AM12にトランスフェクトした（マルコビッツ（Markowitz）ら、167バイロロジー（Virology）400、1988）。トランスフェクトした細胞を培地へのG418の添加によって選択し、耐性細胞をプールした。ベクター含有ウイルス上澄みを、各構築体を含有する細胞から単離し、10の感染度（MOI）にて10<sup>4</sup>E86/B2A細胞を感染させた。レトロウイルス媒介遺伝子移入を用いて、リボザイム含有鋳型をトランスフェクションの代わりにE86/B2Aに導入して、E86/B2A細胞系のクローン単離に関連する可変lacZ発現の可能な問題を回避した。

形質導入したE86/B2A細胞を増殖させ、細胞内に存在するβ-ガラクトシダーゼ活性につき、および該細胞から出現するneo<sup>r</sup>およびlacZウイルス力価につき分析した（図3）。対照ベクター、N2AまたはN2A:Hamβ1Dを含有する細胞と比較して、機能性ハンマーヘッドベクター、N2A:Hamβ1GおよびN2A:Hamβ2Gを含有する細胞で、β-gal活性の有意な減少は観察されなかった。同様に、種々のベクター含有細胞から出現したneo<sup>r</sup>ウイルス力価に差異は認められなかった。しかしながら、N2A:Hamβ1GおよびN2A:Hamβ2G含有細胞からのlacZウイルス力価は、対照ベクター含有細胞と比較して90-92%減少した（図3）。

前記した実験において、10<sup>4</sup>E86/B2A細胞を10のMOIで感染させ、増殖させ、lacZウイルス力価および蛋白質生産の減少につきアッセイした。すべての細胞がリボザイムを含有するレトロウイルスベクターを含有することを保証とするために、該細胞はG418では選択しなかった。回避ウイルスの8-10%のうちいずれがリボザイム構築体を欠く細胞から生起したかを決定するために、N2A:Hamβ感染細胞をG418で選択し、lacZウイルス力価および蛋白質生産の減少についてアッセイした。N2A:Hamβ1GおよびN2A:Hamβ2Gを含有するG418選択したE86/B2A細胞から生起し

た

l a c Z ウイルス力価は、対照ベクターを含有する G 4 1 8 選択細胞と比較して 9 5 - 9 7 % 減少した。再度、これらの細胞で  $\beta$  - g a l 活性の減少は認められなかった。

阻害を回避する l a c Z ウイルスの最後の 3 - 5 % は、少なくとも部分的には、2つの l a c Z ゲノムの1つのウイルス粒子へのパッキングに由来するものであろう (図 1 D)。RNA ゲノムのパッキングが全体としてランダムであるならば、ウイルス粒子の約 1 % が 2 つの l a c Z ゲノムを含有すると予測されるであろう。何故ならば、リボザイム含有ゲノムは細胞内の l a c Z ウイルスゲノムに対して 1 0 倍過剰だからである。

これらの結果は、細胞内におけるその基質と共にリボザイムを共局所化することは、in vivoにおいてその標的RNAの効率的な切断に必須であるという証拠を提供する。さらに、該結果は、かかる共局所化はin vivoにおける標的化RNAのリボザイム媒介切断につき律速であり、ウイルス遺伝子発現のリボザイム媒介阻害を改良するために、in vivoでその基質をリボザイムが見い出す速度を増大させなければならないことを示す。

第2の実験において、1 0<sup>4</sup>E 8 6 / B 2 A 細胞を種々のMOIで感染させて、細胞内で転写体を含有する基質に対するリボザイムの相対的比率がどのようにこれらの細胞から出現する l a c Z ウイルス力価の阻害のレベルに影響するかを決定した。予測されたごとく、N 2 A : H a m  $\beta$  1 G および N 2 A : H a m  $\beta$  2 G に関しては、MOI を 1 0 から 2 ないし 0. 4 まで低下させるに従い l a c Z ウイルス力価の阻害が減少し；対照的に、対照ベクターをこれらのMOIで感染させるのに用いた場合、l a c Z 力価に有意な変化は起こらなかった (図 4)。これは、l a c Z ウイルス力価の阻害がキメラ局所化シグナル-ウイルス阻害剤の存在に直接関係していることを示す。

本実施例は、ウイルス局所化シグナルは、抗ウイルス剤を標的化してほとんど 1 0 0 % のウイルス殺傷効率を提供するのに使用できることを示す。パッキングシグナルの使用を説明したが、当業者ならが他のウイルス局所化シグナルを用い



ることができることを認識するであろう。薬剤の部位および標的が同一であると

いうことのみが重要である。加えて、該実施例はリボザイム剤を用いたが、いずれの他のRNA、DNAまたは他の薬剤も同等に十分に局所化され、その効率が増強されることは明らかである。

以下の実施例は、RNA形態の新規な局所化シグナルの構築法を示す。本実施例は本発明を限定するものではなく、当業者ならば他の化学品でかかる展開を行うことができ、従って、本発明で利用できることを認識するであろう。これらの実施例は2つのRNAの共発現に関連するが、当業者ならば、標準的な技術を用いて、他のタイプの分子、例えば、A Z TおよびH I Vの局所化シグナルを一緒に結合させることができるのを認識するであろう。

#### RNAの生起

前記したごとく、局所化シグナルとして異なる結合特性を達成するのに生起されたRNAを使用することは可能である。例えば、RNAを試験管中で生起させて、細胞でいくらか特別の方法で局所化した所与の蛋白質を特異的に認識させることができる。かくして、かかるRNAは、特定の細胞区画を特異的に認識するかまたは探し出すのに使用でき、また、前記したごとき局所化シグナルとして本発明で利用できる。かくして、生起したRNAを用いて、蛋白質が結合する細胞区画を特異的に標的化することができる。このようにして、RNAを用いて、適当な細胞部位における殺傷または他の薬剤の濃度を増大させることができる。例えば、転写因子NF $\kappa$ Bに結合するRNAをin vitroで選択することができる。特に、RNAプールを蛋白質NF $\kappa$ Bと共にインキュベートし、該蛋白質に結合するRNAを単離し、増幅し、ポリメラーゼ鎖反応または他の増幅反応を介してin vitroで生起させることができる。所望の蛋白質NF $\kappa$ Bに結合するRNAが生起するまでこのプロセスを反復する。H I V感染細胞において、かかる生起したRNAはNF $\kappa$ Bに結合し、転写因子に沿ってH I V遺伝子発現の部位に局所化される。従って、該RNAベースNF $\kappa$ B局所化シグナルに治療剤を繋ぐことによって、該RNAを用いて、治療剤（例えば、抗-H I Vリボザイム）をH I V遺伝子発現の部位に局所化することができる。かかる生起したRNAは、治療

剤を特定の細胞もしくは組織へと標的化するのに有用である。例えば、RNAを

生起させて肝臓細胞上のレセプターに結合させることができる。治療剤にかかるRNAに繋ぐことは、それを肝臓へと標的化するであろう。

これらのRNAは、特定の細胞もしくは組織を標的化するのに特に有用である。例えば、RNAを生起させて肝臓細胞上のレセプターに結合させることができる。治療剤にかかるRNAに繋ぐと、それを肝臓へと標的化するであろう。また、かかるRNAを用いて治療剤を特異的細胞に標的化することができる。例えば、I型糖尿病においては、自己反応性B細胞はその表面にインスリンレセプターを認識する自己抗体を産生し発現する（ツアング（Zhang）およびロス（Roth）、88プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci.）USA 9858、1991）。RNAをin vitroで生起させてかかる抗体に結合させることができる。特に、RNAのプールを抗体と共にインキュベートし、該抗体に結合するRNAを免疫沈殿させることができる。次いで、増幅手法（例えば、ポリメラーゼ鎖反応）によって、沈殿したRNAをさらに生起させ、該プロセスを、所望の抗体可変ドメインに結合するRNAが生起されるまで反復する（ツァイ（Tsai）ら、89プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci.）USA 8864、1992）。同時に、ナチュラルキラー細胞またはいくつかの他のエフェクター細胞上のレセプターに結合する第2のRNAを生起させることができる。次いで、2つのRNA結合ドメインを結合させ、または一緒に合成して、自己抗体発現細胞および自己反応性B細胞にキラー細胞を誘因する治療剤に対する局所化シグナルを形成することができる。このようにして、局所化シグナルは特異的抗体産生B細胞を標的化し、治療剤は、ナチュラルキラー細胞がかかる抗体産生B細胞を標的化し、それにより、有用な治療剤を産生することを確実とするように作用する。かくして、本実施例が例証するごとく、レセプター結合シグナルをコードするRNAを使用して、他の細胞を、例えば、標的化レセプターを発現する細胞へ動員することによって、治療剤を直接または間接に局所化することができる。

## 用途

前記系は、治療剤のin vivo投与のみならず、ウイルスフリー細胞を維持するのが重要なin vitro細胞培養にも有用である。例えば、特異的ウイルス局所化シグナルに結合したキメラアンチセンスRNA分子をコードするDNAを細胞に供することができる。かかるキメラ構築体を、細胞が、その細胞に侵入するいずれのウイルスも殺しまたはその複製も妨げることができるいずれかの所望の方法で、プロモーターから発現させることができる。このようにして、in vitroでの細胞培養においてウイルス感染を回避することができる。また、かかる構築体は、予防剤もしくは治療剤いずれかとして個体をウイルスフリーに維持するのが重要なin vivo状況で用いることもできる。かかるDNAは標準的な遺伝子治療技術によって導入できるか、あるいはエレクトロポレーションによってRNAをいずれかの所望の部位に直接注射することができる。当業者ならば、他の標準的な技術を用いて、本発明のキメラ薬剤を導入することができよう。

また、個体をウイルスフリーに維持したり、あるいは個体のウイルス負荷を減少させるのが重要なin vivo状況において、抗ウイルス構築体を用いることができる。かかる局所化された抗ウイルス剤によるウイルス複製の阻害は、予防剤もしくは治療剤いずれかとして使用できる。例えば、標準的な遺伝子治療技術を用いて、ヒト・リンパ球もしくはプレリンパ球に転写を導入するのに使用でき、その結果、HIVパッキングシグナルに繋いだ抗-HIVリボザイムをコードするRNAが発現される。抗-HIVリボザイムを含有する細胞がHIVによって感染されると、リボザイムはHIVパッキングの部位に局所され、HIVゲノムRNAを切断することによってウイルス複製を阻害する。このようにして、個体において、HIVの増殖を低下させ、または阻害することができる。発現された薬剤が適当な局所化シグナルに繋がれてその効率を増強するように設計された他の抗ウイルス薬剤をコードする遺伝子は、標準的な遺伝子治療技術（例えば、レトロウイルスもしくは他のウイルスベクターの使用）または種々の物理的移行技術（例えば、リポソーム）によって個体に移行させることができる。当業者ならば、他の標準的な技術を用いて本発明のキメラ薬剤を導入できることを認識するで

あろう。

また、本発明で議論したキメラ薬剤をコードする遺伝子を用いて、ウイルスの感染もしくは複製に耐性のトランスジェニック植物および動物を作出することもできる。例えば、トリ白血症ウイルス（ALV）RNAを切断するように設計されたリボザイムおよび該ALVウイルスのパッキングシグナルの双方を含有するRNAが発現される転写単位を作成することができる。この転写単位をコードするDNAを用いて、かかるDNAをニワトリ胚系細胞に移入することによりトランスジェニックニワトリを作出することができる。該トランスジェニックニワトリにおいて、すべての細胞はキメラ抗-ALVトランスジェン（transgene）を含有し、それを発現する。かくして、ALVがトランスジェニックニワトリに感染すると、該動物において、ウイルスの拡大は減少もしくは除去される。何故ならば、キメラ抗-ALVリボザイムをコードする転写体はニワトリ細胞中でALVゲノムRNAと共局所化され、それを切断するだろうからである。このようにして、ウイルスが引き起こした病気の重症度は、トランスジェニック植物および動物双方において、大いに減少もしくは除去される。

### 投与

選択された薬剤、例えば、オリゴヌクレオチドもしくはリボザイムは、例えば、適当なデリバリビヒクルによって（例えば、リポソーム、制御放出ビヒクル）、イオン電気導入、エレクトロポレーションまたはイオン対分子、または共有結合したアダクト、その他薬理学上認められたデリバリ法によって、当該薬剤の感染組織への外因性デリバリにより、予防的に、あるいは標的疾患に罹った患者に投与することができる。投与経路は、筋肉内投与、アエロゾル投与、経口投与（錠剤もしくは丸剤形態）、局所投与、全身投与、眼内投与、腹腔内投与および／またはくも膜下投与を包含する。リボザイムでの免疫化のための発現ベクターおよび／またはオリゴヌクレオチドのデリバリも適当である。

いずれの選択された薬剤の特異的デリバリ経路も当該薬剤の使用に依存する。一般的に、各薬剤についての特異的デリバリプログラムは、細胞内局所化に関する裸の薬剤摂取、続いての効率の証明に焦点を当てるであろう。別法として、動

物の器官もしくは組織における同一の細胞のデリバリを追求することもできる。

摂取研究は、例えば、デリバリビヒクルもしくは戦術を問わず、細胞オリゴヌクレオチド摂取を評価するための摂取アッセイを包含する。かかるアッセイは、摂取に続く薬剤の細胞内局所化を決定し、最終的に、標的配列を含有する細胞区画（核および／または細胞質）内の定常的濃度の維持についての要件を確立する。次いで、効率および細胞毒性をテストすることができる。毒性は細胞活性のみならず細胞機能を包含する。

使用できるいくつかのデリバリ方法は：

- a. リポソーム中へのカプセル化
  - b. レトロウイルスベクターによる形質導入
  - c. コレステロールとのコンジュゲーション
  - d. ほとんどの s n RNA 上に見い出される抗原結合部位を利用する核区画への局所化
  - e. ヌクレオチド誘導体を用いることによるリボザイムの電荷の中和
  - f. 身体全体にリボザイムを分布させるための血液幹細胞の使用
- を包含する。

リボザイム修飾、粒子担体ドラッグデリバリビヒクル、およびレトロウイルス発現ベクターを含めた、少なくとも3つのタイプのデリバリ戦略が本発明で有用である。ほとんどの小さな分子のように、非修飾リボザイムおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ゆっくりなのにも拘わらず、細胞によって摂取される。細胞の摂取を促進するために、本質的にランダムにリボザイムを修飾することができ、その方法では、その電荷を減少させるが、RNA切断活性に必要な特異的官能基を維持する。この結果、細胞膜を通過して拡散でき、かくして、透過性バリアーを除去できる分子が得られる。

電荷を減少させるためのリボザイムの修飾は、これらの大きい分子の細胞摂取を促進するための1つのアプローチである。しかしながら、該ランダムアプローチは、推奨できない。というのは、リボザイムは小さな薬物分子よりも構造的かつ機能的にもより複雑だからである。リボザイムを触媒活性に維持するために必

要な構造的要件は当業者にはよく理解されているであろう（セヒ（Cech）、カル

オブ・ストラクチャル・バイオル（Curr. Op. Structural Biol.）、1992）。これらの要件は、細胞デリバリーを促進するための修飾を設計する場合に考慮される。また、該修飾は、ヌクレアーゼ分解に対する感受性を減少させるように設計される。これらの特徴は共にリボザイムの効率を大いに改良するであろう。細胞摂取は、リボザイム切断活性に必要なホスホジエステル結合を変更する必要なくして、いくつかのオーダーの大きさだけ増大させることができる。

リン酸骨格の化学的修飾は、負の電荷を減少させ、それにより、膜を通っての拡散を容易にするであろう。この原理は、アンチセンスDNA技術につき首尾よく証明されている。DNAおよびRNAの間の化学的組成における類似性はこれを可能なアプローチとする。身体中において、外部濃度の維持が、修飾リボザイムの組織細胞への拡散を駆動するのに必要であろう。疾患組織を薬物の一時的な高濃度に暴露し、全身吸収によってゆっくりとこれが消散される投与経路が好ましい。リボザイムの循環半減期を増大させるように設計された薬物担体と共に静脈内投与することができる。薬物担体のサイズおよび組成は血流からの迅速なクリアランスを制限する。感染部位に蓄積するようにされた担体はリボザイムを分解プロセスから保護できる。

ドラッグデリバリービヒクルは全身および局所投与双方で効果的である。それらは、徐放容器として働く、またそれらの内容物を標的細胞に直接送達するように設計できる。直接的デリバリー薬物ビヒクルを用いる利点は、多くの分子が摂取当たり送達されることである。かかるビヒクルは、血流から迅速にクリアされる薬物の循環半減期を増大させることが示されている。この範疇に入るかかる特別の薬物デリバリービヒクルのいくつかの例は、リポソーム、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル（nanocapsule）、および生接着性マイクロスフィアである。

デリバリー系のこの範疇からでは、リポソームが好ましい。リポソームは細胞内安定性を増大させ、摂取効率を増大させ、また、生物学的活性を改良する。リポ

ソームは、細胞膜を形成する脂質と同様に配列された脂質からなる中空球状小胞である。それらは、水溶性化合物をトラップするための内部水性空間および直径

0.05ないし数ミクロンのサイズ範囲を有する。いくつかの研究は、リポソームはRNAを細胞に送達できること、および該RNAは生物学的に活性なままであることを示している。

例えば、元来研究ツールとして設計されたリポソームデリバリビヒクルであるLipofectinは、無傷mRNA分子を細胞に送達し、対応する蛋白質を産生することが示されている。

リポソームはいくつかの利点を提供する。それらは組成物において非毒性であって生分解性であり；それらは、長い循環半減期を呈し；認識分子は組織への標的化のためにそれらの表面に容易に付着させることができる。最後に、液状懸濁液または凍結乾燥生成物のコスト的に有利な製造は、許容される薬物デリバリ系としてのこの技術の有用性を示す。

ノノ粒子 (nonoparticle) およびヒドロゲルのごとき他の制御放出薬物デリバリ系は、リボザイム用の可能なデリバリビヒクルである。これらの担体は化学治療剤用に開発されており、その結果、蛋白質ベースの医薬がリボザイムデリバリに適し得る。

リボザイムの局所投与は有利である。というのは、最小全身吸収を維持しつつ投与部位の局所化濃度を可能とするからである。これは、疾患部位へのリボザイムのデリバリ戦略を単純化し、毒物学的キャラクタリゼーションの程度を低下させる。さらに、適用すべき物質の量は、他の投与経路に必要なものよりも大いに低いものである。効果的なデリバリは、リボザイムが感染細胞に拡散することを要する。負の電荷を中和するためのリボザイムの化学的修飾が、貫通に必要なすべてである。しかしながら、電荷の中和が不十分である場合、そこでは修飾されたリボザイムは、リポソームにおいて、Azzoneまたはオレイン酸のごとき透過性促進剤と共に共処方できる。リポソームは、修飾リボザイムおよび透過性促進剤がリポソームから感染細胞に移行する徐放性提示ビヒクルとできるか、あるいはリポソームリン脂質を、細胞デリバリを容易にするにおいて、修飾リボザイムお

よび透過性促進剤と共に直接参画することができる。いくつかの場合において、リボザイムおよび透過性促進剤は徐放のために坐薬処方に処方できる。

また、リボザイムは全身投与できる。全身吸収とは、血流に薬物を蓄積させ、続いて全身に分布させることをいう。全身吸収に導く投与経路は、静脈内、皮下、腹腔内、鼻孔内、くも膜下および眼内投与を包含する。これらの投与経路の各々は、リボザイムを接近可能な疾患組織に暴露する。皮下投与物はリンパ節に入り、リンパネットワークを通じて循環系へと進行する。循環系への侵入速度は、分子量または分子サイズの関数であることが示されている。リボソームまたは他の薬物担体の使用はリボザイムをリンパ節に局所化させる。リボザイムは修飾して細胞内に拡散させるか、あるいはリボソームは修飾もしくは非修飾リボザイムの細胞へのデリバリーに直接参加できる。

リボザイムをリンパ球およびマクロファージの表面に会合させることができるリボソーム処方も有用である。これは、マクロファージの特異性および感染細胞のリンパ球免疫認識を利用することによって、HSV-感染細胞への促進されたデリバリーを提供するであろう。全血実験は、該処方は37℃での8時間後にはリンパ球の90%によって摂取されることを示している。予備的生体内分布および薬物動態学的研究では、静脈内投与の1時間後に、脾臓において、注射用量/gm組織の70%を生じた。

腹腔内投与も、循環への侵入に導かれ、リボザイムデリバリービヒクル複合体の分子量もしくはサイズが侵入速度を制御する。

静脈内注射されたリボソームは、肝臓、肺および脾臓に蓄積される。組成およびサイズは、この蓄積が注射された用量の30%ないし40%を表すように調整できる。残りは24時間までの間、血流中を循環する。

デリバリーの選択した方法の結果、患部細胞の細胞質に蓄積され、分子は最適投与量についていくらかヌクレアーゼ耐性を有する。核デリバリーを用いることができるが、好ましくない。最も好ましいデリバリー方法は、リボソーム(10-400nm)、ヒドロゲル、制御放出ポリマー、ノイクロインジェクションまたはエレクトロポレーション(ex vivo処理につき)および他の医薬上適用可能なビヒ



クルを包含する。用量は病気の症状および投与経路に依存するが、100-200mg/kg体重/日の間となろう。治療の持続は、病気の兆候の間にわたり、通

常、少なくとも15-16日であり、恐らく継続的となろう。複数の日用量が局所投与、眼適用および腔適用に予測される。用量数は疾患デリバリビヒクルおよび臨床試験からの効能データに依存するであろう。

細胞内のリボザイムの治療レベルの確立は摂取および分解の速度に依存する。分解度を減少させると、リボザイムの細胞内半減期を延長させるであろう。かくして、例えば、リン酸骨格を修飾した、またはヌクレオチドアナログでリボザイムの5'および3'末端をキャッピングした化学的修飾リボザイムは異なる投与量を必要とするであろう。有用な系の記載は、ここに引用した本明細書の一部とみなす前記引用の文献に提供されている。

本発明は、リボザイム、アンチセンス分子およびデコイRNAの投与に特に有用であり、前記した例が示すごとく、本発明で最も有利に使用することができる。このようにして治療できる特定の病気は、例えば、HSV、HBV、EBV、およびHIV感染のごときRNA；ならびに種々の担体によって治療できるいずれの病気をも包含する（ここに、標的分子は公知の細胞区画に位置する）。

他の具体例も以下の請求の範囲内のものである。

# 【図1A】

A. レトロウイルスベクター

1. B2A

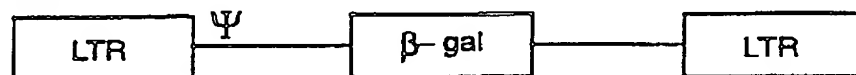


FIG. 1A

【図1B】

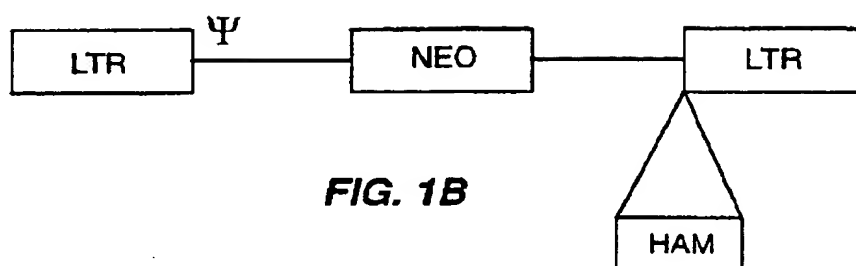
2. N2A:HAM $\beta$ S

FIG. 1B

【図1C】

B. パッキング細胞における転写されたB2A RNAの運命

▨: B2A RNA

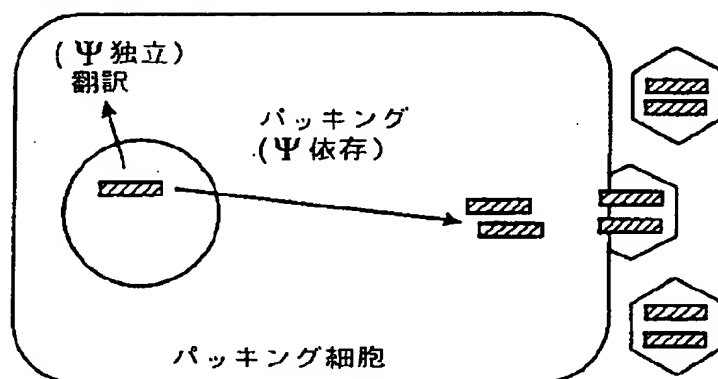


FIG. 1C

【図1D】

C. 共局所化／阻害戦術

▨: B2A RNA

▬: N2A:HAM RNA

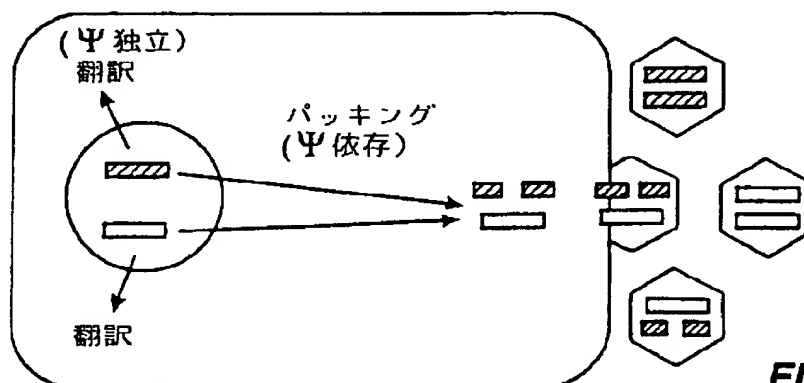


FIG. 1D

## 【図2】

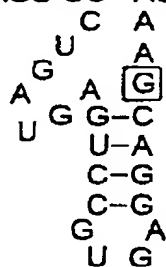
## Hamβ1G

Hamβ1GおよびHamβ1Dについての暗号オリゴヌクレオチド配列  
(四角に入れたヌクレオチドはHamβ1Dでは欠失):

5' - CGT AGT GTC TGA TGA GTC CGT GAG GAC **G**AA ACG CGA TCG G - 3'

## Hamβ1G リボザイム配列

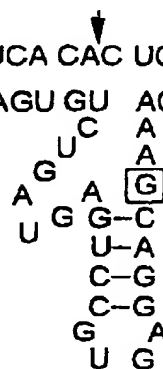
5' - CGU AGU GU ACG CGA UCG G - 3'



## Hamβ1G リボザイムでの標的β1配列

3' - GCA UCA CAC UGC GCU AGC C - 5'

5' - CGU AGU GU ACG CGA UCG G - 3'



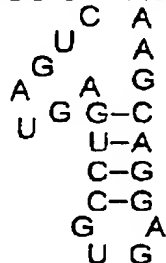
## Hamβ2G

Hamβ2Gについての暗号オリゴヌクレオチド配列 :

5' - TTC CGC CAC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACG CCA CTG C - 3'

## Hamβ2G リボザイム配列

5' - UUC CGC CA ACG CCA CUG C - 3'



## Hamβ2G リボザイムでの標的β2配列

3' - AAG GCG GUC UGC GGU GAC G - 5'

5' - UUC CGC CA ACG CCA CUG C - 3'

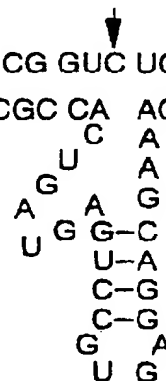


FIG. 2

【図3】

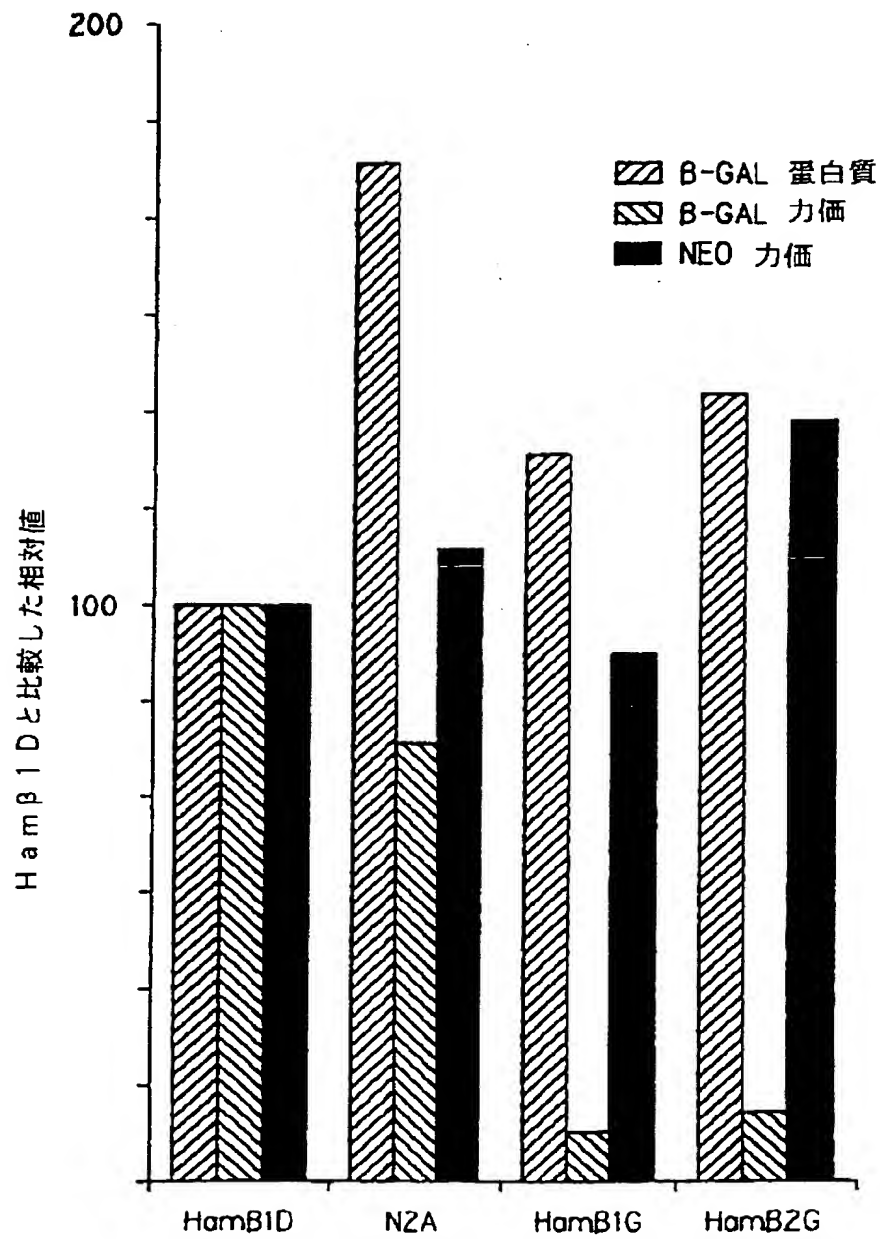


FIG. 3

【図 4】

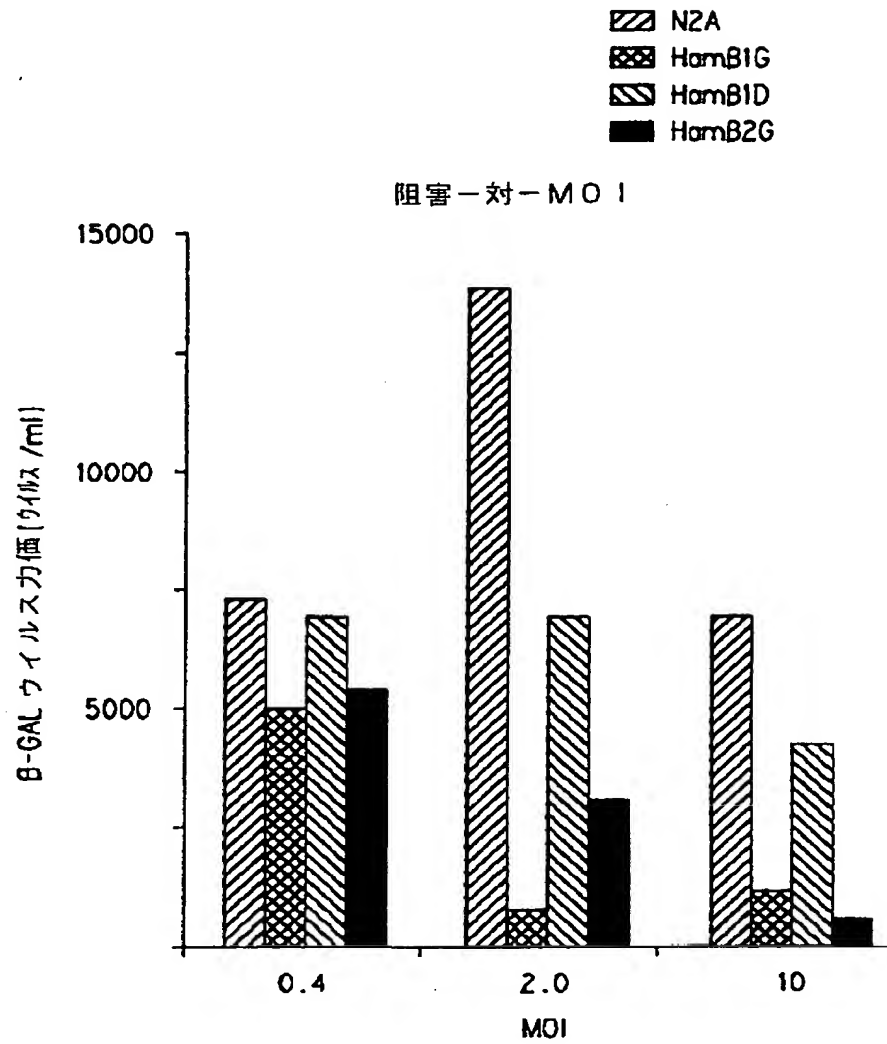


FIG. 4

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/12657

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : A61K 48/00; C12N 15/86

US CL : 424/93R, 93A; 514/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/93R, 93A; 514/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG DATABASES: BIOSIS PREVIEWS, MEDLINE, AIDSLINE, WORLD PATENTS INDEX, CA SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nature, Volume 318, issued 05 December 1985, R. Tellier et al., "New strategies for AIDS therapy and prophylaxis," page 414. See entire letter to the editor.	1-8
X	International Conference on AIDS, Volume 7, Number 2, meeting 16-21 June 1991, M.C. Poznansky et al., "The use of an HIV-1 based retroviral vector to transfer antiviral constructs into human lymphocytes in vitro," page 25, see abstract No. W.A.13.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	"X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier documents published on or after the international filing date	"Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)	"A" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 February 1994	Date of mailing of the international search report MAR 21 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. NOT APPLICABLE	Authorized officer JOHNNY F. RAILEY, II, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/12657

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of Virology, Volume 65, Number 10, issued October 1991, M. Weerasinghe et al., "Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Infection in Human CD4+ Lymphocyte-Derived Cell Lines Conferred by Using Retroviral Vectors Expressing an HIV-1 RNA-Specific Ribozyme," pages 5531-5534, see entire article.	1-8